Таблица 2
Влияние охлаждения и замораживания сперматозоидов на содержание НАДН и ФАД и их процентное соотношение при различных функциональных тестах (n = 10)

Вариант	Интенсивность флюоресценции			
	Свежеполученная сперма		Заморожено-оттаянная	
	НАД.Н, %	ФАД, %	НАД.Н, %	ФАД, %
Свежеразбавленная: усл. ед.	12±1,7	3±0,4	9±0,5	6±0,9
%	100	100	100	100
+ пируват + сукцинат	105±5,5	107±3,5	102±3,9	106±6,6
+ ДНФ	37±5,9	46±7,6	49±3,9	79±4,9
+ антимицин	83±12	120±19,0	64±5,2	82±4,7

ния лишь на 15 и 3%, т.е. реакция сперматозоидов на добавление 2,4-ДНФ и ингибитораов дыхания после замораживания-оттаивания снижается. Это свидетельствует о разобщении и частичном нарушении начального НАД.Н зависимого участка дыхательной цепи.

Сравнительное исследование дыхания сперматозоидов хряков и петухов показало идентичность в характере ответных реакций на действие сукцината, 2,4-динитрофенола и антимицина А. Различия заключались лишь в силе ответа на действие тестирующих веществ.

Таким образом, после температурного шока полностью нарушается регуляция электронно-транспортной системы спермотозоидов, после замораживания-оттаивания имеет место разобщение и частичное нарушение начального НАД - зависимого участка дыхательной цепи. Следовательно, при совершенствовании метода криоконсервации спермы необходимо вести изыскание способов защиты 1-го пункта (участка) дыхательной цепи как наиболее чувствительного.

РЕЗЮМЕ

Исследовали редокс-реакции НАД.Н и ФАД при разбавлении, охлаждении и замораживании-оттаивании сперматозоидов хряков и петухов с использованием ингибитора дыхания антимицина А и разобщителя дыхания 2,4-динитрофенола (ДНФ). Установлено, что холодовой шок неразбавленной спермы приводит к резкому снижению количества НАД.Н и ФАД.

После замораживания-оттаивания сперматозоидов наблюдается увеличение окисленности НАД и ФАД и снижение реакции на добавление ДНФ и антимицина. Результаты оценки редокс-состояния НАД и ФАД , полученые флюоресцентным методом, согласуются с полярографическими данными по реакции дыхания сперматозоидов в ответ на действие ингибиторов дыхания и ДНФ после охлаждения и замораживания-оттаивания спермы.

SUMMARY

Redox-reactions of NAD.H and FAD of boar and cock sperm during diluting, cooling and freezing - thawing were studied. 2,4-dinitrophenol (DNP) and antimycin were used as testing substances. It was established, that cold shock of undiluted sperm results in great reduction of NAD.H and FAD amount.

The growth of oxidation of NAD and FAD sperm after freezing - thawing was observed. Reduction of reaction on injecting 2,4-DNP and antimycin was as well. The results of estimation of a redox-condition NAD and FAD provided by a fluorescent method well correlated with data of polarographic estimation of spermatozoa respiration after cooling and freezing - thawing.

УДК: 57.085.23:615.014.41

Л.Г. Абрафикова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (ИПКиК)

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОХРАННОСТИ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ПОД ЗАЩИТОЙ И БЕЗ КРИОПРОТЕКТОРА

Изучали жизнеспособность фибробластов человека после криоконсервирования с криопротектором ДМСО (10%) и без него.

Суспензию клеток в ростовой среде 199 и в среде 199 с добавлением 10% ДМ-

СО замораживали с медленной скоростью до -196° С и хранили при этой температуре в течение 1 года (срок наблюдения). Было установлено, что основная гибель клеток происходила на этапах замораживания-отогрева. Более высокая жизнеспособность наблюдалась при замораживании под защитой ДМСО (43-45%).Сохранность клеток в питательной среде 199 без ДМСО составляла 23-26%.

Сам процесс хранения при постоянной температуре жидкого азота (-196° С), дополнительной гибели клеток, замороженных с криопротектором и без него, не вызывал.

SUMMARY

During cryopreservation of human fibroblasts slow freezing in 199 medium with adding 10% DMSO as cryoproptectant provides higher survival rate. Storage process at -196° C does not cause an additional cell death.

Т.И. Акимочкина

Астраханский Государственный Университет

ПЕРСПЕКТИВЫ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГИИ СПЕРМИЕВ РЫБ С ЦЕЛЬЮ ОЦЕНКИ ИХ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТОЯНИЯ ПОСЛЕ ХРАНЕНИЯ В УСЛОВИЯХ СВЕРХНИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

В проблеме сохранения генофонда редких и исчезающих видов рыб многие научные коллективы России используют традиционную криотехнологию, где основным хладоагентом для хранения репродуктивных клеток животных является жидкий азот. При замораживании основным фактором повреждения спермиев и других клеток является напряжение, возникающее в результате кристаллизации воды. Чтобы предотвратить деструктивное влияние на клетки сверхнизкой температуры, перед замораживанием к нативной сперме добавляют искусственную среду сложного состава, которая служит криопротектором. В современной литературе опубликовано много работ по вопросам изучения криозащитных свойств различных веществ. Эффективность протекторов обычно оценивают по времени и количеству (в %) подвижных клеток. Как правило подвижность спермиев после дефростации резко снижается, но по опубликованным в последние годы данным оплодотворяющая способность их сохраняется.

С целью изучения возможности оплодотворения нативной икры севрюги дефростированной спермой в 2005 году нами были проведены экспериментальные исследования на Кизанском рыбоводном заводе Астраханской области. После размораживания подвижность спермиев была крайне низкой, а количество активных клеток составило не более одного процента. Несмотря на столь низкую подвижность спермиев нами зарегистрирована не только оплодотворяемость, но и выклев личинок. Вероятно, оплодотворение произошло за счет диффузии спермиев в яйцеклетку.

Важно отметить, что оплодотворяемость икры была выше, чем выклев личинок, который составил несколько процентов от общего количества икры. Полученные нами предварительные данные исследований в принципе согласуются с опубликованными в научной литературе фактическими материалами.

Таким образом, кроме подвижности спермиев их качество после хранения в условиях сверхнизкой температуры следует также оценивать по морфологическим признакам.

С этой целью мы использовали способы световой микроскопии мазков спермы. После получения спермы от производителей приготавливали мазок на предметном стекле, таким же приемом, как и для приготовления мазков крови. Мазок спермы подсушивают на воздухе, фиксируют в этаноле и окрашивают гематоксилин-эозином. Затем краску смывают, ополаскивая водой, и высушивают. Микроскопируют клетки в иммерсионном масле при увеличении 7×90. В ходе микроскопии регистрируют следующие показатели: